

上调 miR-140 增强 人 CML 细胞株 KBM5R 对伊马替尼的敏感性

郑 研, 李 岚*, 高秋英, 牛 奔, 张维华
(陕西省人民医院 血液内科, 陕西 西安 710068)

摘要:目的 探究 miR-140 对伊马替尼(IM)耐药慢性髓系白血病(CML)细胞株 KBM5R 的 IM 敏感性的影响及其机制。方法 分别用 RT-qPCR 和 Western blot 检测 CML 细胞系 KBM5 和 KBM5R 细胞中 miR-140 和 Bcl-2 的表达水平。将 miR-NC 或 miR-140 mimic 转染入 KBM5R 细胞, 然后用 25~100 nmol/L 的 IM 处理细胞 24 h, CCK-8 法检测细胞活力。用 100 nmol/L 的 IM 处理已转染 miR-NC 或 miR-140 mimic 的 KBM5R 细胞 24 h, 流式细胞测量术检测细胞凋亡, JC-1 染色检测线粒体膜电位, Western blot 检测 cleaved caspase-3 表达。用生物信息学与荧光酶活性分析法验证 miR-140 与 Bcl-2 之间的靶向关系。结果 与 KBM5 细胞比较, KBM5R 细胞中 miR-140 表达水平明显降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 表达水平明显增加 ($P < 0.001$)。在 IM 存在的条件下, 与 miR-NC 组比较, miR-140 mimic 转染组的细胞活力明显降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 细胞凋亡明显增加 ($P < 0.001$), 线粒体膜电位明显降低 ($P < 0.001$), cleaved caspase-3 表达水平明显增加 ($P < 0.001$)。Bcl-2 是 miR-140 的靶标。结论 miR-140 可能通过抑制靶基因 Bcl-2 来增加 KBM5R 细胞对 IM 的敏感性。

关键词: miR-140; Bcl-2; KBM5 细胞; 伊马替尼; 敏感性

中图分类号: R733.7 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2022.09.1344

Up-regulation of miR-140 enhances the sensitivity of human CML cell strain KBM5R to imatinib

ZHENG Yan, LI Lan*, GAO Qiu-ying, NIU Ben, ZHANG Wei-hua
(Department of Hematology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of miR-140 on the sensitivity of imatinib (IM)-resistant chronic myeloid leukemia (CML) cell strain KBM5R to IM and potential underlying mechanism. **Methods** The expression level of miR-140 and Bcl-2 in CML cells KBM5 and IM resistant CML cells KBM5R were detected by RT-qPCR and Western blot, respectively. KBM5R cells were transfected with miR-NC or miR-140 mimic, and then incubated with 25–100 nmol/L IM for 24 h. Cell viability was examined by CCK-8 assay. KBM5R cells transfected with miR-NC or miR-140 mimic were examined with 100 nmol/L IM for 24 h then cell apoptosis was detected by flow cytometry; Mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining, and cleaved caspase-3 expression was detected by Western blot. The targeting relation between miR-140 and Bcl-2 was verified by bioinformatics and

收稿日期: 2021-07-16 修回日期: 2021-12-08

基金项目: 陕西省科技厅社会发展科技攻关项目 (2015SF065)

* 通信作者 (corresponding author): lilanff96@126.com

fluorescence activity analysis. **Results** Compared with KBM5 cells, the expression of miR-140 in KBM5R cells was significantly decreased ($P < 0.01$) and the expression of Bcl-2 was significantly increased ($P < 0.001$). In the presence of IM, compared with the miR-NC group, the cell viability in miR-140 mimic group was significantly decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.001$); Cell apoptosis was significantly increased ($P < 0.001$); Mitochondrial membrane potential was significantly decreased ($P < 0.001$), and cleaved caspase-3 expression was significantly increased ($P < 0.001$). Bcl-2 was a target of miR-140. **Conclusions** miR-140 may increase the sensitivity of KBM5R cells to IM by inhibiting the target gene Bcl-2.

Key words: miR-140; Bcl-2; KBM5 cells; imatinib; sensitivity

慢性髓系白血病(简称慢粒)(chronic myeloid leuke-mia, CML)是一种以费城染色体和断裂点簇集区-艾贝尔逊白血病病毒(breakpoint cluster region-abelson leukemia virus, BCR-ABL)融合基因为特征的骨髓增生性疾病。BCR-ABL 具有高酪氨酸激酶活性,可激活如丝裂原活化蛋白激酶、Janus 激酶/信号传导与转录激活子和磷脂酰肌醇 3-激酶等多种通路的信号活性。这些通路的激活可增加 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)蛋白的表达,最终促进 CML 细胞恶性增殖^[1-2]。虽然伊马替尼(imatinib, IM)、尼罗替尼和达沙替尼等酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)能明显改善 CML 患者的预后并延长预期寿命,但依然约有 20% 的患者 TKIs 耐药^[3]。因此,逆转 TKIs 耐药性对 CML 的治疗具有重要意义。

近年来,微小 RNAs(microRNAs, miRNAs)被广泛认为是调节包括 CML 在内的多种癌进展以及化学耐药的关键参与者^[4]。但 miRNA 种类繁多,其在 CML 的分子机制仍未得到很好的阐明。业已发现,miR-140 是胃癌、骨肉瘤和结肠癌中的抑癌基因^[5-7]。尽管 miR-140 在多种类型的癌中具有强烈的抗肿瘤作用,但其在 CML 中调节化学耐药的潜在机制仍未完全明确。因此,本研究以 IM 敏感 CML 细胞 KBM5 和 IM 耐药 CML 细胞 KBM5R 为材料,旨在研究 miR-140 对 KBM5R 的 IM 敏感性的影响以及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞:人 CML 细胞系 KBM5(上海传秋生物科技有限公司)。

1.1.2 试剂和试剂盒:胎牛血清、DMEM 培养基和 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司);TaqMan miRNA

分离试剂盒、TaqMan microRNA 测定试剂盒和 TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems 公司);miR-140 mimic 和阴性对照(miR-NC)(由上海吉玛公司合成);快速点突变试剂盒(Agilent 公司);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂及蛋白质提取和定量试剂盒(陕西脉元生物科技有限公司);抗 cleaved caspase-3 和 Bcl-2 抗体(CST 公司);CCK-8 法细胞计数试剂盒和 JC-1 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);抗 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗(北京百奥莱博科技有限公司);伊马替尼(IM,纯度 $\geq 99\%$)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养与 IM 耐药细胞株 KBM5R 构建:将 KBM5 细胞接种在含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素和 1% 链霉素的 DMEM 培养基中,置于在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。按照文献[3]方法,将 KBM5 细胞通过暴露在浓度递增的 IM 中,获得 IM 耐药的 KBM5R 细胞株。

1.2.2 细胞的转染:在转染细胞前,先将 KBM5R 细胞接种在无血清、青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中 12 h,然后根据转染试剂的说明书步骤,用 Lipofectamine 2000 试剂分别将 60 nmol/L 的 miR-140 mimic 或 miR-NC 转入细胞。转染后 48 h,收集细胞,用 RT-qPCR 检测 miR-140 mimic 的转染效率后,用于后续实验。

1.2.3 RT-qPCR 检测 miR-140 相对表达量:用 TaqMan miRNA 分离试剂盒从 KBM5 和 KBM5R 细胞以及已转染 miR-140 mimic 或 miR-NC 的 KBM5R 细胞中提取 miRNAs。用 TaqMan microRNA 测定试剂盒进行 miRNA 定量的测定。用 TaqMan Universal PCR Master Mix 反应试剂盒和各引物在 ABI 7500

实时定量 PCR (qPCR) 系统进行分析。反应条件为 95 °C 10 min, 然后进行 40 个循环(95 °C 15 s, 60 °C 1 min)。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-140 相对于内部对照 *U6* 的表达量。引物的序列如下: miR-140 (正向): 5'-GAGTGTCACTGGTTTACCCT-3', miR-140 (反向): 5'-GCAGGTCAGGATTC-3'; *U6* (正向): 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3', *U6* (反向): 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGC-3'。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞活力: 将已转染 miR-140 mimic 或 miR-NC 的 KBM5R 细胞以 3×10^6 个细胞/mL 接种到 6 孔培养板中, 分别用 0、25、50、75 和 100 nmol/L 的 IM 处理 24 h。每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 并在 37 °C 温育 4 h 后, 用酶标仪在波长 450 nm 处检测吸光度 (*A*) 值。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞测量术检测细胞凋亡: 用 100 nmol/L 的 IM 将已转染 miR-140 mimic 或 miR-NC 的 KBM5R 细胞处理 24 h 后, PBS 洗涤细胞 2 次, 用无 EDTA 的胰蛋白酶消化, 收集细胞。按照试剂盒说明书步骤, 在室温避光下进行 annexin V-FITC 和 PI 染色。用流式细胞仪分析细胞凋亡。

1.2.6 JC-1 染色评估线粒体膜电位: 用 100 nmol/L 的 IM 将已转染 miR-140 mimic 或 miR-NC 的 KBM5R 细胞处理 24 h 后, 在 37 °C 避光下进行 JC-1 染色。用荧光显微镜拍照, 并用 Image J 软件分析红色荧光和绿色荧光的荧光强度。

1.2.7 荧光素酶活性分析验证 miR-140 与 *Bcl-2* 的靶向关系: miRanda 在线软件 (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) 预测 *Bcl-2* 的 3' UTR 中存在 miR-140 结合位点。用点突变试剂盒将预测 *Bcl-2* 基因 3' UTR 与 miR-140 结合的位点的基因序列进行点突变, 并用 PCR 将 *Bcl-2* 基因的 3' UTR 以及已点突变的 3' UTR 的基因序列扩增并分别插入荧光载体中, 构建野生型 (WT) *Bcl-2* 3' UTR 和突变型 (MUT) *Bcl-2* 3' UTR 荧光载体质粒。用 Lipofectamine 2000 将 miR-140 mimic 或 miR-NC 以及 WT-*Bcl-2* 3' UTR 或 MUT-*Bcl-2* 3' UTR 质粒共转染到细胞中。转染 48 h 后, 通过双荧光素酶报告分析系统分析荧光素酶活性。

1.2.8 Western blot 检测 *Bcl-2* 和 cleaved caspase-3 的表达: 分别取 KBM5 和 KBM5R 细胞、已转染

miR-140 mimic 或 miR-NC 的 KBM5R 细胞以及 100 nmol/L IM 处理 24 h 的已转染 miR-140 mimic 或 miR-NC 的 KBM5R 细胞, 提取细胞的蛋白质, 并定量蛋白的浓度。按照常规程序, 用 Western blot 检测 *Bcl-2*、cleaved caspase-3 相对与内参 β -actin 的相对表达水平。

1.3 统计学分析

计量数据用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS18.0 软件将实验中所获得的数据进行统计学分析。两组之间均数比较, 采用 *t* 检验; 多组之间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 miR-140 在 KBM5 和 KBM5R 细胞中的表达

KBM5R 细胞中 miR-140 的表达水平为 0.25 ± 0.13 明显低于 KBM5 细胞的 0.99 ± 0.04 ($P < 0.01$)。

2.2 过表达 miR-140 对 KBM5R 细胞伊马替尼敏感性的影响

与 miR-NC 组比较, miR-140 mimic 转染组中 miR-140 的表达水平明显增加 ($P < 0.01$); 在 25 ~ 100 nmol/L 的 IM 存在的条件下, 与 miR-NC 组比较, miR-140 mimic 转染组的细胞活力明显降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 在 100 nmol/L 的 IM 条件下, 与 miR-NC 组比较, miR-140 mimic 转染组的细胞凋亡明显增加 ($P < 0.001$) (图 1)。

2.3 过表达 miR-140 对 KBM5R 细胞的线粒体膜电位和 cleaved caspase-3 表达的影响

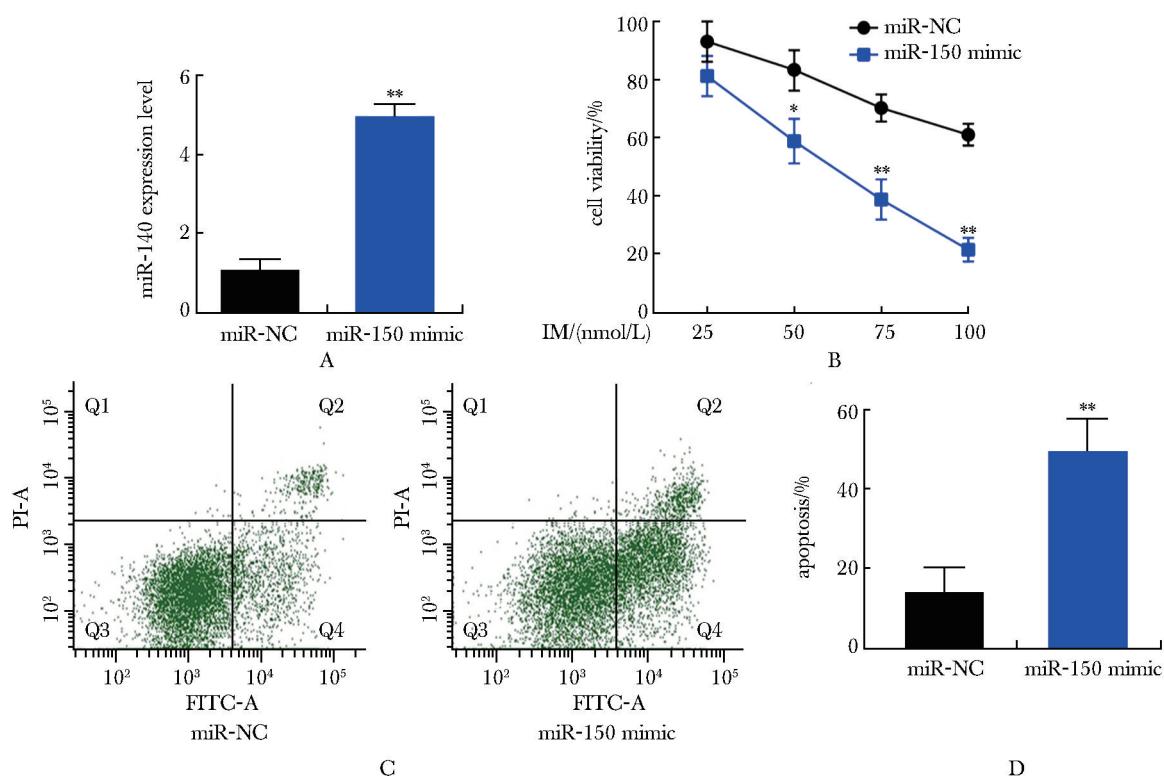
在 100 nmol/L 的 IM 条件下, 与 miR-NC 组比较, miR-140 mimic 转染组线粒体膜电位明显降低 [表现为绿色荧光强度/红色荧光强度明显增加 ($P < 0.001$)], cleaved caspase-3 表达水平明显增加 ($P < 0.001$) (图 2)。

2.4 *Bcl-2* 是 miR-140 的靶标

与 KBM5 细胞相比, KBM5R 细胞中 *Bcl-2* 表达水平明显增加 ($P < 0.001$) (图 3A); 与 miR-NC 组比较, miR-140 mimic 转染组 *Bcl-2* 表达水平明显降低 ($P < 0.001$) (图 3B); *Bcl-2* 是 miR-140 的靶基因 (图 3C)。

3 讨论

尽管已经进行了许多研究试图克服对抗癌药的



A. after transfected into KBM5R cells with miR-NC or miR-140 mimic, the expression level of miR-140 was detected by RT-qPCR; B. KBM5R cells transfected with miR-NC or miR-140 mimic were treated with 25 – 100 nmol/L IM for 24 hours; Cell viability was detected by CCK-8 assay; C-D. KBM5R cells transfected with miR-NC or miR-140 mimic were treated with 100 nmol/L IM for 24 hours; Cell apoptosis was detected by flow cytometry; * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ compared with miR-NC group

图 1 过表达 miR-140 增强 KBM5R 细胞对伊马替尼的敏感性

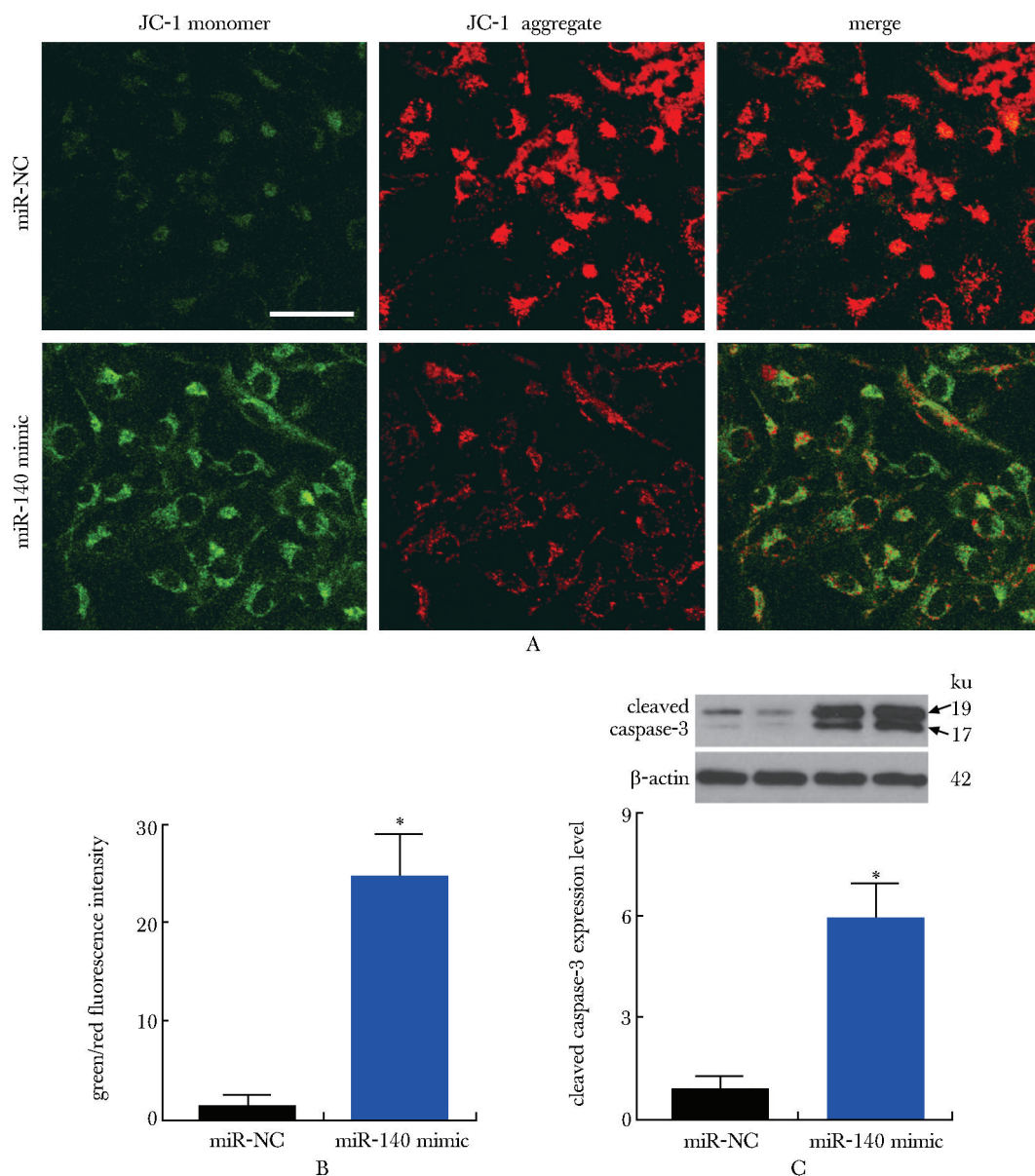
Fig 1 Over-expression of miR-140 enhanced the sensitivity of KBM5R cells to imatinib ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

耐药性,但化疗耐药仍然是目前治疗 CML 患者的主要障碍。CML 最常见的耐药机制是 ABL 激酶结构域(kinase domain, KD)点突变,其在耐药 CML 患者中约占 50%,尤其是获得性耐药患者^[8]。TKIs 的主要治疗靶点即为 ABL KD,而其突变严重阻碍 TKIs 与 ABL 激酶的结合,并最终影响 CML 的疗效^[9]。因此,必须发现除 ABL KD 之外的其他目标,以优化患者对 TKIs 的反应。

关于 miRNA 参与调控肿瘤化疗敏感性的作用的研究逐渐受到研究人员的关注。此前的研究已经证实 miR-140 在多种肿瘤中发挥抑制肿瘤的作用^[5-7]。最近研究^[10]表明,miR-140 可促进非小细胞肺癌细胞对顺铂的敏感性。本研究使用 IM 耐药 CML 细胞系 KBM5R 和正常 CML 细胞系 KBM5 探索了 miR-140 与 IM 耐药之间的关系,并通过将 miR-140 mimic 转染到 KBM5R 细

胞中来研究过表达 miR-140 对 IM 敏感性的影响。结果显示,miR-140 在 KBM5R 中表达显著下调,过表达 miR-140 能抑制 KBM5R 的增殖活性并促进了细胞凋亡,降低线粒体膜电位和增加 cleaved caspase-3 表达。这些发现表明,miR-140 表达降低可能是 CML 的 IM 耐药的机制之一,而上调 miR-140 能增强 KBM5R 细胞对 IM 的敏感性。

MicroRNA(miRNA)是通过与靶 mRNA 的 3'非翻译区(3'-UTR)的碱基以互补配对结合方式负调控基因表达来发挥生物学效应。因此,鉴定 miR-140 靶基因对于理解其在 CML 的 IM 耐药中的作用非常重要。本研究发现,miR-140 在 KBM5R 中能够直接靶向 *Bcl-2* 的 3'-UTR 并负调节 *Bcl-2* 蛋白表达。*Bcl-2* 具有促进细胞存活的作用,同样抑制 *Bcl-2* 表达能抑制细胞活性和促进细胞凋亡。最近的研究强调了 *Bcl-2* 在维持骨髓白血病干细胞干性和存活中



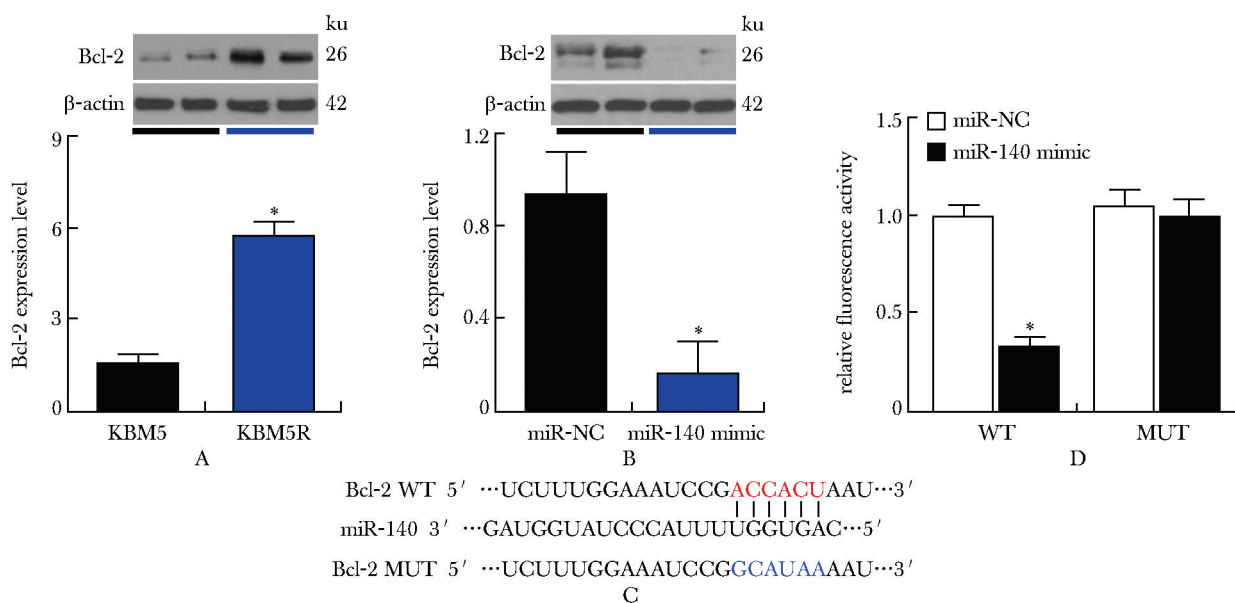
A, B. KBM5R cells transfected with miR-NC or miR-140 mimic were treated with 100 nmol/L IM for 24 hours; Mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining (scale bar = 10 μ m); C. cleaved caspase-3 expression was detected by Western blot; * $P < 0.001$ compared with miR-NC group

图 2 过表达 miR-140 对 KBM5R 细胞的线粒体膜电位和 cleaved caspase-3 表达水平的影响

Fig 2 Effects of over-expression of miR-140 on mitochondrial membrane potential and the level of cleaved caspase-3 expression in KBM5R cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

的重要作用^[11]。也有报道证明, Bcl-2 抑制剂 ABT-737 和 ABT-263 可明显增强 TKIs 诱导的原发性 CML 细胞死亡^[12-13]。因此, 这些结果证实 miR-140 通过靶向 Bcl-2 增强 KBM5R 的敏感性。

总之, 本研究表明 miR-140 表达下调可能是导致 CML 的 IM 耐药的关键因素, 上调 miR-140 能通过 Bcl-2 增强 KBM5R 对药物的敏感性。



A. expression of Bcl-2 in KBM5 and KBM5R cells was detected by Western blot; B. expression of Bcl-2 in KBM5R cells transfected with miR-NC or miR-140 mimic was detected by Western blot; C. *Bcl-2* and miR-140 targeted binding sites predicted by miRanda software; D. targeting relationship between *Bcl-2* and miR-140 was verified by fluorescence activity analysis; * $P < 0.001$ compared with miR-NC group

图3 *Bcl-2* 是 miR-140 的靶标

Fig 3 *Bcl-2* was a target of miR-140 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

参考文献:

- [1] Singh P, Kumar V, Gupta SK, *et al.* Combating TKI resistance in CML by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway in combination with TKIs; a review[J]. *Med Oncol*, 2021, 38;10. doi: 10.1007/s12032-021-01462-5.
- [2] 于游游,李彬,闫婷,等. miR-221 对慢性粒细胞白血病 K562 细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26; 1311-1317.
- [3] Lan X, Zhao C, Chen X, *et al.* Nickel pyrithione induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib via both Bcr/Abl-dependent and Bcr/Abl-independent mechanisms[J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9; 129. doi: 10.1186/s13045-016-0359-x.
- [4] Litwińska Z, Machaliński B. MiRNAs in chronic myeloid leukemia: small molecules, essential function[J]. *Leuk Lymphoma*, 2017, 58; 1297-1305.
- [5] Zhao M, Liu Q, Liu W, *et al.* MicroRNA-140 suppresses helicobacter pylori-positive gastric cancer growth by enhancing the antitumor immune response [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20; 2484-2492.
- [6] 陈翔,黄路,张中卒,等. miR-140 在骨肉瘤组织中表达降低及其过表达可促进骨肉瘤 U2 细胞的凋亡[J]. *基础医学与临床*, 2016, 36; 439-444.
- [7] Jiang W, Li T, Wang J, *et al.* miR-140-3p suppresses cell growth and induces apoptosis in colorectal cancer by targeting PD-L1[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12; 10275-10285.
- [8] Baccarani M, Rosti G, Soverini S. Chronic myeloid leukemia; the concepts of resistance and persistence and the relationship with the BCR-ABL1 transcript type[J]. *Leukemia*, 2019, 33; 2358-2364.
- [9] Braun TP, Eide CA, Druker BJ. Response and resistance to BCR-ABL1-targeted therapies[J]. *Cancer Cell*, 2020, 37; 530-542.
- [10] Lin Z, Pan J, Chen L, *et al.* miR-140 resensitizes cisplatin-resistant NSCLC cells to cisplatin treatment through the SIRT1/ROS/JNK pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13; 8149-8160.
- [11] Carter BZ, Mak PY, Mu H, *et al.* Combined targeting of BCL-2 and BCR-ABL tyrosine kinase eradicates chronic myeloid leukemia stem cells[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8; 355ra117. doi: 10.1126/scitranslmed.aag1180.
- [12] Goff DJ, Court Recart A, Sadarangani A, *et al.* A pan-BCL2 inhibitor renders bone-marrow-resident human leukemia stem cells sensitive to tyrosine kinase inhibition [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12; 316-328.
- [13] Kuroda J, Kimura S, Andreeff M, *et al.* ABT-737 is a useful component of combinatory chemotherapies for chronic myeloid leukaemias with diverse drug-resistance mechanisms[J]. *Br J Haematol*, 2008, 140; 181-190.